

University of Groningen

Pulmonary arterial hypertension

van Albada, Mirjam Ellen

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2007

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

van Albada, M. E. (2007). *Pulmonary arterial hypertension: cardiovascular effects of pharmacological intervention*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Nederlandse samenvatting



Aangeboren hartafwijkingen zijn de meest voorkomende aangeboren afwijkingen. In Nederland worden elk jaar ongeveer 1500 patiënten met een hartafwijking geboren. Patiënten die een hartafwijking hebben die gepaard gaat met een toegenomen longcirculatie lopen het risico om pulmonale arteriële hypertensie (PAH) te ontwikkelen. Dit is een vasoproliferatieve ziekte waarbij er door remodelering van de longvaten een toename van de longvaatweerstand optreedt. Het is een irreversibele aandoening met een slechte prognose, die ook voortschrijdt na chirurgische correctie van de hartafwijking. PAH is een belangrijke oorzaak van de morbiditeit en mortaliteit bij patiënten met een aangeboren hartafwijking. Als gevolg van de toegenomen belasting van de rechterkamer ontstaat rechter ventrikelf hypertrofie en uiteindelijk ook falen van de rechterventrikel.

Er bestaan nog geen behandelingsmogelijkheden voor PAH. In theorie zou men verschillende behandeldoelen kunnen nastreven. Een reductie van de pulmonale vaatweerstand zou helpen de afterload van de rechterventrikel te reduceren. Tevens zou het beïnvloeden van de rechterventrikel adaptatie gunstig kunnen zijn. Onder omstandigheden waarin de rechterventrikel wordt belast, hypertrofieren de cardiomyocyten, waarbij er een verminderde beschikbaarheid van zuurstof ontstaat en fibrose optreedt. Deze veranderingen leiden op den duur tot een slecht functionerend myocard. Derhalve zouden gunstige effecten verwacht kunnen worden van therapieën die de remodelering van de rechterventrikel beïnvloeden. Hoewel er veel ervaring bestaat met het behandelen van aandoeningen die gepaard gaan met falen van de linkerventrikel en met reductie van de remodelering van de linkerventrikel, is het niet mogelijk deze kennis direct toe te passen bij aandoeningen gepaard gaande met rechter ventrikelfalen aangezien de ventrikels verschillen in functie, vorm en samenstelling. Therapeutische strategieën die zich richten op het terugdringen van de celproliferatie in de longvaten zelf zullen naar verwachting het meest effectief zijn bij de behandeling van PAH.

Om succesvolle behandelingen te ontwikkelen is kennis van de pathofysiologische veranderingen die bijdragen tot het ontstaan van de longvaatremodelling en de rechter ventrikelf hypertrofie essentieel. Dit zou kunnen leiden tot de ontwikkeling van therapieën die deze progressieve aandoening kunnen vertragen, stoppen of zelfs genezen. De belangrijkste pathologische processen die optreden in PAH zijn pulmonale vasoconstrictie, trombose, inflammatie en proliferatie. In patiënten met PAH wordt een toegenomen expressie van vasoconstrictieve, pro-inflammatoire, pro-trombotische en proliferatieve stoffen zoals endotheline, serotonine en thromboxaan gevonden, terwijl de vorming van vasodilaterende, anti-trombotische en anti-proliferatieve stoffen is afgenomen.

De afgelopen decennia zijn er nieuwe behandelingsvormen voor PAH ontdekt. Epoprostenol, een analoog van de vaatverwijdende stof prostacycline, wordt succesvol toegepast bij de behandeling van patiënten met PAH. Bosentan is een endotheline-receptor blocker die geregistreerd is voor de behandeling van PAH. Ook sildenafil, een blocker van het enzym fosfodiësterase, is recent geregistreerd. Het enzym fosfodiësterase is betrokken bij de afbraak van cyclisch GMP (cGMP). cGMP zorgt normaal gesproken voor vasodilatatie. Alhoewel deze therapieën ef-

fectief zijn, bestaat er tot nu toe helaas geen behandeling die de ziekte kan genezen.

Karakterisering van patiënten

Patiënten die een aangeboren hartafwijking hebben gepaard gaande met PAH vormen een heterogene groep. Dit komt omdat veel verschillende hartafwijkingen, met de daarmee geassocieerde variatie in hemodynamiek, tot het ontstaan van de ziekte kunnen leiden. Deze heterogeniteit bemoeilijkt de standaardisatie van onderzoek en behandelingsprotocollen. Op het Tweede Wereldsymposium over pulmonale hypertensie in 1998, werd het symptoom pulmonale hypertensie gedefinieerd als een pulmonale arteriële druk van meer dan 25 mmHg in rust of meer dan 30 mmHg tijdens inspanning. Pulmonale hypertensie wordt gegroepeerd in vijf verschillende categorieën, afhankelijk van de oorzaak. PAH vormt de eerste van deze vijf categorieën. De eerste categorie onderscheidt zich van de andere categorieën door een kenmerkend histologisch beeld, de zogenaamde plexogene arteriopathie. Dit beeld wordt alleen gezien in patiënten met PAH. Behalve bij patiënten met aangeboren hartafwijkingen wordt PAH ook gezien bij mensen met andere aandoeningen, zoals collageenziekten, HIV infecties en portale hypertensie. Tevens komt PAH idiopathisch voor.

Om de kenmerken van een patiënt met PAH en een congenitale hartafwijking die van belang zijn voor diagnose, therapie en behandeling goed te kunnen beschrijven, is een verdere onderverdeling van deze heterogene groep noodzakelijk. Door een dergelijke subclassificatie kunnen ook het ontwerp, de uitvoering en de interpretatie van klinische studies effectiever plaatsvinden. In **hoofdstuk 2** van dit proefschrift worden de kenmerken van een dergelijke classificatie geschetst, gebaseerd op het type defect, de afmetingen van het defect, de richting van de shunt, of het een pre-tricuspidale of een post-tricuspidale shunt is, of de laesie restrictief is of niet, of de laesie gecorrigeerd is of niet en of er verdere extracardiale afwijkingen aanwezig zijn. Overigens wordt het merendeel van de klinische trials betreffende PAH gedaan bij patiënten met idiopathische PAH of in een gemengde populatie van patiënten met PAH op basis van diverse oorzaken. De gunstige therapeutische effecten beschreven in idiopathische PAH kunnen echter niet automatisch vertaald worden naar patiënten met PAH gecombineerd met een congenitale hartafwijking, aangezien de ontstaanswijze van de pulmonale vaatafwijkingen, de circulatoire fysiologie, de prognose en de effecten van vasodilerende interventies verschillen. Hoewel de effecten van prostacycline analogen, van endotheline-receptor antagonisten en van fosfodiësterase-remmers niet zo uitgebreid bestudeerd zijn bij patiënten met PAH en een congenitale hartafwijking, lijkt er wel een zekere effectiviteit van deze interventies te zijn.

In studies bij volwassenen met PAH zijn functionele parameters en hemodynamische variabelen uitkomstmaten die vaak worden gebruikt. Helaas kennen deze uitkomstmaten hun beperkingen bij kinderen. Een rechter hartkatheterisatie om pulmonale arteriële drukken te verkrijgen dient altijd onder algehele anesthesie te gebeuren, met alle nadelen van dien. Functionele testen zoals inspanningstest-

ten zijn afhankelijk van motivatie en zijn onbruikbaar bij de jongere kinderen. Derhalve is er behoefte aan geschikte, makkelijk te verkrijgen parameters die gerelateerd zijn aan bekende prognostische factoren zoals rechter atriumdruk, rechter ventrikeldruk, pulmonale vaatweerstand en aan mortaliteit zelf. In **hoofdstuk 3** worden merkstoffen, gemeten in het bloed, die gevalideerd zijn in een volwassen patiëntenpopulatie, geëvalueerd voor hun bruikbaarheid in een pediatrische patiëntenpopulatie met PAH. Bij 30 patiënten werden het serum N-terminal pro-brain natriuretisch peptide (NT-proBNP), het urinezuur en de noradrenaline en adrenaline spiegels gerelateerd aan invasieve hemodynamische gegevens, aan functionele inspanningstesten en aan mortaliteit. In deze patiëntenpopulatie, in leeftijd variërend van 1 maand tot 17 jaar, bleken zowel NT-proBNP als noradrenaline sensitieve en specifieke voorspellers voor mortaliteit. De NT-proBNP spiegel correleerde verder met de afstand die patiënten in zes minuten konden lopen en met de functionele classificatie volgens de World Health Organisation. Bovendien werd er een relatie gevonden tussen het urinezuur en de gemiddelde pulmonale arteriële druk, de pulmonale vaatweerstand en het geïndexeerde hartminuutvolume. Na therapeutische interventie namen de NT-proBNP spiegels af. Hieruit blijkt dat implementatie van meting van NT-proBNP, noradrenaline en urinezuur in de follow-up van kinderen met PAH een waardevolle aanvulling kan zijn. In de gepresenteerde studie werden de serumwaardes van de specifieke merkstoffen van zowel behandelde als onbehandelde patiënten gegroepeerd. Ook bestond de studiepopulatie zowel uit patiënten met idiopathische PAH als uit patiënten met PAH veroorzaakt door een onderliggende aangeboren hartafwijking. Het is goed voorstelbaar dat een gescheiden analyse nog gevoeliger afkapwaarden zou kunnen genereren. Verder zou het interessant zijn om te onderzoeken of de merkstoffen worden beïnvloed door de verschillende therapeutische interventies.

De ontwikkeling van een geschikt diermodel

De aanwezigheid van een toegenomen longdoorstroming onderscheidt patiënten met PAH en een aangeboren hartafwijking van diegenen met een andere vorm van PAH. Een toegenomen longdoorstroming leidt door stimulatie van het endotheel tot activatie van een cascade van gebeurtenissen met effect op de celproliferatie. Patiënten die een hartafwijking hebben die uitsluitend gepaard gaat met een hoge druk in het longvaatbed ontwikkelen zelden ernstige pulmonale vaatwandremodellering, terwijl dit juist wel wordt gezien bij patiënten met een hoge druk in het pulmonale vaatbed wanneer die gepaard gaat met een toegenomen longdoorstroming. Patiënten die een geïsoleerde toename in longvaatdoorstroming hebben, zoals bijvoorbeeld patiënten met een atrium septum defect, ontwikkelen uiteindelijk wel PAH, maar meestal pas op veel latere leeftijd. Deze waarnemingen leidden tot de hypothese dat een toegenomen longvaatdoorstroming essentieel is voor de activatie van processen die een onaangepaste celdeling in de longvaten veroorzaken.

Er werd een diermodel ontwikkeld waarin het longvaatbed werd blootgesteld aan een toegenomen longdoorstroming om zo de ernstige histologische laesies

die gezien worden bij patiënten met PAH, zoals neointima vorming, te creëren. Er werd gekozen voor een combinatie van monocrotaline injecties in de rat, een klassiek model voor een toegenomen druk in de longvaten, met een abdominale aortocavale shunt om de longvaatdoorstroming te doen toenemen. In **hoofdstuk 4** van dit proefschrift worden de effecten van een geïsoleerde toename in longvaatdoorstroming en een geïsoleerde toename in pulmonale arteriële druk vergeleken met een combinatiemodel waarin er een toename van zowel de longvaatdoorstroming als van de pulmonale arteriële druk bestaat. De effecten van deze verschillende modellen op de pulmonale arteriële druk, op remodellering van de rechterventrikel, op rechter hart falen en op de remodellering van de longvaten zijn in dit hoofdstuk beschreven, terwijl de effecten van deze modellen op moleculair niveau zijn beschreven in **hoofdstuk 5**.

Oclusie van de kleine weerstandsvaatjes trad in ratten met en zonder shunt in gelijke mate op. Hoewel de pulmonale arteriële drukken in beide groepen gelijk waren, was de sterfte in ratten met de combinatie van een verhoogde druk en een verhoogde longvaatdoorstroming hoger, hadden zij hogere ratio's tussen de pulmonale arteriële druk en de systeemdruk en hadden zij een meer uitgesproken rechterventrikel hypertrofie. Ratten die alleen een abdominale aortocavale shunt hadden, ontwikkelden geen significante veranderingen in pulmonale arteriële druk, in remodellering van de pulmonaalvaten of in rechter ventrikelhypertrofie ten opzichte van gezonde controleratten.

De effecten van een toegenomen longvaatdoorstroming op moleculair niveau werden geëvalueerd met behulp van een microarray. Deze techniek maakt de gelijktijdige bestudering van de expressie van meer dan 25 duizend genen mogelijk. In ons diersysteem voor flow-geassocieerde PAH veroorzaakte een toegenomen longvaatdoorstroming een toename in de expressie van activator transcription factor 3 (ATF3) en early growth response protein 1 (Egr-1). Dit zijn beide transcriptiefactoren die bij activatie bijdragen aan disfunctie van hart en vaten. Interessant genoeg bevat de promotor van de bone morphogenetic protein type 2 receptor, een receptor waarin bij patiënten mutaties zijn beschreven, Egr-1 bindingsplaatsen. De Wnt familie speelt een rol in de ontwikkeling van de long alsook in verschillende pathologische processen, zoals inflammatie en proliferatie. In onze studie vonden we veranderingen in de expressie van verschillende componenten van het Wnt systeem. Frizzled related protein B (FrzB), een remmer van de Wnt-signaling, was verhoogd in ratten die zowel monocrotaline als een shunt hadden gekregen. Carboxypeptidase Z, een stimulator van de Wnt-signaling, was verhoogd in ratten die behandeld waren met monocrotaline. In ratten die zowel monocrotaline als een shunt hadden gekregen, was carboxypeptidase Z juist afgenomen. Na toediening van monocrotaline werd tevens een verhoogde expressie van mestcelmarkers gevonden. Geactiveerde mestcellen zouden een rol kunnen spelen in vaatremodellering door het vrijmaken van specifieke proteases uit hun granules. Inderdaad vonden we in de longen van ratten behandeld met monocrotaline, net als in patiënten, een toename van het aantal mestcellen.

Concluderend leidt de combinatie van monocrotaline en een abdominale aortocavale shunt in ratten tot een model waarin het longvaatbed is blootgesteld

aan dezelfde veranderingen als die optreden in patiënten met een aangeboren hartafwijking en waarin ernstige longvaatlaesies aanwezig zijn die vergelijkbaar zijn met die van humane patiënten met plexogene arteriopathie. Zowel monocrotaline als een toegenomen longvaatdoorstroming zorgen voor veranderingen in gen-expressie die zouden kunnen bijdragen aan de pathogenese van humane PAH. Het bestuderen van veranderingen die op moleculair niveau in dit model optreden leidt tot het ontdekken van nieuwe systemen die van belang kunnen zijn in de pathogenese van flow-geassocieerde PAH.

Effecten van farmacologische interventie

Het bovengenoemde rattenmodel voor flow-geassocieerde PAH werd gebruikt om het werkingsmechanisme van verschillende behandelvormen te evalueren. Prostacycline is een werkzame stof bij de behandeling van flow-geassocieerde PAH. Het werkingsmechanisme van dit middel was echter nog niet onderzocht. Aangezien in de urine van patiënten met PAH de concentratie van thromboxaan-metabolieten verhoogd is, verwachtten we dat het verlagen van thromboxaan-concentraties, door het toedienen van aspirine, vergelijkbare effecten zou hebben als het toedienen van prostacycline. In **hoofdstuk 6** worden de effecten van behandeling met de prostacycline-analoog iloprost vergeleken met de effecten van behandeling met aspirine. Beide interventies verminderden de incidentie van dyspneu en pleuravocht. Deze veranderingen gingen echter niet gepaard met een significante verbetering van de remodellering van de longvaten, maar wel met een verbetering van de capillarisatie van de rechterventrikel. Op moleculair niveau verhoogde de behandeling met prostacycline de expressie van verschillende genen van de Wnt-familie. Het uiteindelijke effect van deze regulatie is moeilijk te beoordelen aangezien de verhoogde expressie van deze factoren zowel stimulators als remmers van de Wnt signalering betrof. Verder remde iloprost toediening de proliferatie van mestcellen. Dit zijn interessante therapeutische mechanismen die verder onderzocht dienen te worden.

Een nadeel van de prostacycline-analoog iloprost is zijn korte halfwaardetijd. Treprostinil is een analoog met een langere halfwaardetijd die geschikt is voor subcutane toediening. De effecten van treprostinil toediening op de pulmonale hemodynamiek en op remodellering van de longvaten werd onderzocht in **hoofdstuk 7**. Treprostinil zorgde voor een daling in de gemiddelde pulmonale arteriële druk. Net als bij iloprost ging deze daling niet gepaard met een veranderde remodellering van het pulmonale vaatbed, hetgeen mogelijke effecten op contractiliteit van de rechterventrikel of op vasculaire stijfheid suggereert.

Antagonisme van de endotheline-receptor is een andere effectieve behandeling van patiënten met PAH en een congenitale hartafwijking. In **hoofdstuk 8** worden de effecten van blokkade van het endotheline-systeem in flow-geassocieerde PAH beschreven. De remodellering van de longvaten verminderde na behandeling met bosentan, een endotheline-receptor antagonist die beide receptoren blokkeert. Tegelijkertijd zorgde toediening van bosentan voor een daling van de pulmonale arteriële druk, een afname van de rechter ventrikelhypertrofie en een verbeterde

contractiliteit van de rechterventrikel. Dit ging gepaard met een toegenomen capillarisatie van de rechterventrikel. Deze toename in capillarisatie en geassocieerde verbetering van de contractiliteit zijn mogelijk een direct gevolg van de blokkade van het endotheline-systeem. Een andere optie is dat de verbeterde myocardiale functie het gevolg is van een verminderde afterload.

Blokkade van het endotheline-systeem zorgde ook voor een toegenomen ratio in de expressie tussen de endotheline-A en de endotheline-B receptor. Dit zou beschouwd kunnen worden als contra-regulatie, aangezien bosentan een wat hogere affiniteit voor de A-receptor dan voor de B-receptor heeft. Deze bevindingen leiden tot de vraag of deze veranderde receptor expressie ook invloed heeft op het verdere verloop van de ziekte bij patiënten waarbij het gebruik van bosentan wordt gestopt. Aangezien de activatie van endotheline-receptoren complex is, en er bij de activatie van deze receptoren cross-talk, heterodimerisatie en desensitisatie een rol spelen, is het niet mogelijk om klinische consequenties aan deze data te verbinden. Desalniettemin illustreren deze data de noodzaak voor verder studies naar de lokalisatie en functie van de endotheline-receptoren.

In het laatste hoofdstuk wordt een nieuwe behandelingsoptie bestudeerd. Erythropoietine (EPO) is een hormoon waarvan de productie wordt gestimuleerd door hypoxie. EPO stimuleert de proliferatie en differentiatie van erythroïde voorlopercellen. Bovendien bezit EPO cytoprotectieve en pro-angiogene eigenschappen. Dus werden recentelijk de effecten van de EPO-toediening op ischemisch linker ventrikelfalen onderzocht. In een diermodel voor hypoxische pulmonale hypertensie bleek een toegenomen EPO-productie bescherming te bieden tegen de ontwikkeling van de ziekte. Daarom bestudeerden we de effecten van EPO-toediening in flow-geassocieerde PAH in **hoofdstuk 9**. EPO veroorzaakte een toename van de capillarisatie in de rechterventrikel, en een afname van de occlusie van de longvaten. Deze veranderingen gingen echter niet gepaard met een verandering van hemodynamische variabelen. In theorie kunnen verschillende mechanismen bijdragen aan deze gunstige remodeleringseffecten van EPO. Endotheelvoorlopercellen, die uit het beenmerg worden gemobiliseerd na EPO-toediening, zouden zich in het longvaatendotheel kunnen innestelen en de reparatie van beschadigd endotheel stimuleren. Tevens is er gesuggereerd dat de anti-oxidatieve en anti-apoptotische effecten van EPO geëffectueerd worden via haem oxygenase-1 (HO-1). HO-1 is een enzym met krachtige anti-oxidatieve en anti-apoptotische effecten. In patiënten met PAH is een afgenomen expressie van HO-1 aangetoond. Tevens lijkt een inductie van HO-1 gunstige effecten te hebben in experimentele setting.

Samenvattend laten de studies met prostacycline analogen in dit model voor flow-geassocieerde pulmonale arteriële hypertensie gunstige effecten op overleving en hemodynamische parameters zien, zonder duidelijke effecten op de remodelering van de longvaten. Echter, er werden wel gunstige effecten op capillarisatie van de rechterventrikel geconstateerd, die mogelijk gerelateerd zijn aan een verbeterde rechter ventrikelfunctie. Behandeling met een endotheline-

receptor blocker en met EPO daarentegen beïnvloeden de remodelering van de longvaten, hetzij door regressie van bestaande laesies te bewerkstelligen of door het voorkomen van het ontstaan van nieuwe laesies. Toediening van bosentan had bovendien ook gunstige effecten op de capillarisatie en de contractiliteit van de rechterventrikel.

Toekomstperspectieven

Aangezien er geen curatieve behandeling voor PAH beschikbaar is, is het noodzakelijk om nieuwe therapeutische mogelijkheden te bestuderen. Microarray experimenten, zoals beschreven in dit proefschrift, dragen bij tot het vinden van nieuwe behandelingsvormen.

Kleine humane studies laten zien dat de combinatie van medicamenten mogelijk effectiever is dan de separate toediening van deze geneesmiddelen. De combinatie van medicatie met effecten op het myocard met interventies met specifieke effecten op remodelering van de longvaten dient verder onderzocht te worden.

Conclusies

Bij kinderen met PAH levert screening van NT-proBNP, noradrenaline en uinezuur extra informatie over hemodynamiek, inspanningstolerantie en prognose. In de toekomst zou screening van deze merkstoffen de noodzaak tot meer invasieve bepalingen overbodig kunnen maken.

Door monocrotaline injecties te combineren met een toename van de longvaat-doorstroming, veroorzaakt door een abdominale aortocavale shunt, werd er een diermodel gecreëerd met ernstige pulmonale histologische afwijkingen die vergelijkbaar zijn met die van patiënten. Microarray analyse van de gen-expressie niveaus in de longen van deze dieren leverde nieuwe aanknopingspunten op voor systemen die betrokken zijn bij de pathogenese van flow-geassocieerde PAH. Deze systemen kunnen mogelijk een doel vormen voor toekomstige therapeutische interventie. Behandeling met prostacycline analogen en remming van de thromboxaan productie in dit model zorgde voor een verbeterde overleving, veranderingen in hemodynamiek en in capillarisatie van het myocard, zonder duidelijke effecten op de remodelering van de longvaten. Daar staat tegenover dat behandeling met bosentan en EPO juist effect had op de occlusie van de longvaten. Bosentan had tevens effect op de capillarisatie en functie van de rechterventrikel. Door een gebalanceerde combinatie van werkingsmechanismen te selecteren, kan de behandeling van de patiënt met flow-geassocieerde PAH worden geoptimaliseerd.

